

性率は低率であった。

②遺伝子解析

PCR 陽性産物について遺伝子解析を行い、その結果を NoV と SaV の月別・遺伝子型別の検出状況として表 1 に示した。平成 21 年の 2 月に採取された GI NoV 陽性の 1 検体は GI.7 に分類された。

また、GII NoV 陽性の 94 検体は GII.3:15 検体、GII.4:58、GII.6:19、GII.12:1、GII.13:1 の 5 遺伝子型に分類されたが、GII.4 が占める割合は 61.7% となり、前年の 95.6% と比べて GII.4 の占有率は大きく減少した。GII NoV は感染性胃腸炎の流行時期(11 月～1 月)に一致して高頻度(88/94、93.6.7%)に検出された。

一方、SaV 陽性 3 検体は、全て GI 型に分類され、前年度、高頻度に検出された SaV は GIV 型は全く検出されなかった。

2. 胃腸炎集団発生事例からの NoV と SaV の検出状況

①RT-PCR による検査成績

胃腸炎集団発生 6 事例の患者糞便 119 検体のうち、GI 陽性が 2 事例の 22 検体(22/119, 18.5%)、GII 陽性が 4 事例の 35 検体(36/119, 60.8%)であった。集団発生事例からの SaV 検出例はなかった。前年度の集団発生 18 事例と比べて、集団発生事例数は大きく減少した。

②遺伝子解析

表 2 に胃腸炎集団発生事例から検出された NoV の月別・遺伝子型別の事例数を示した。GI 陽性 2 事例の遺伝子型は、20 年 4 月の GI.1 と 5 月の GI.14 の各 1 事例であった。GII 陽性 4 事例は、GII.3 の 1 事例と GII.4 の 2 事例 GII.6 の 1 事例であった。

3. NoV に対する抗体保有状況調査

図 1 に、愛知県民 200 名(平成 18 年の 7 月から 9 月に採血)の 10 年齢階層別(各 20 名)の NoV に対する抗体保有率を示した。NoV 7 株に対する県民全体の抗体保有率は、Seto 株(G1):23.5%、Chiba 株(G4):30.0%、GII の Sinsiro 株(G3):39.5%、Narita104 株(G4):62.5%、Hokushin 株(G10):33.0%、Chitta 株(G12):39.0%、Kamo 株(G15):38.0%であった。各年齢階層で GII.4 (Narita104)に対する保有率が最も高い傾向が認められ、近年の GII.4 株の流行を反映する結果と考えられた。

D. 考察

愛知県では、平成 20 年の第 51 週で感染症発生動向調査定点あたりの感染性胃腸炎患者報告数が警報開始基準値(20)を超えたことから、感染性胃腸炎は例年並みの流行と考えられたが、20 年度に当所で検査した胃腸炎集団発生事例数は 8 事例と 19 年度の 18 事例と比べて大幅に減少した。19 年度は、18 年度に引き続いて散発事例と集団発生事例から GII.4 が高率に検出されたのに対して、20 年度は GII.4 の占める割合が大きく減少し、GII.3 や GII.6 の占める割合が高くなった。GII.4 の流行規模の縮小が集団発生事例の減少の一要因と推察された。しかし、GII.4 については 2002 年(平成 14 年)以降、2002 年、04 年、06 年に、ウイルス遺伝子の一部が変化した GII.4 変異型の出現が報告されており、今後とも GII.4 の遺伝子進化については注目が必要である。

SaV には 5 つの遺伝子群(Genogroup I ~V)が知られているが、ヒトから検出さ

れるのは I, II, IV, V の 4 遺伝子群である。平成 19 年度は、GI に次いで、GIV が高頻度に検出されたことが特徴的であったが、20 年度は GI のみの検出にとどまり、昨年度、全国的に流行した GIV は全く検出されなかった。SaV についても NoV と同様、食中毒および感染症の両面からの検討が今後とも必要である。

愛知県民の NoV 抗体保有状況調査において、県民全体の GI の 2 株と GII の 5 株に対する保有率を比べると、GII の Narita104 株 (G4) に対する保有率が最も高率であった。NoV は継代細胞で増殖できないため NoV に対する中和抗体価の測定は現時点では困難である。ELISA で検出される NoV 抗体の感染防御における役割は不明であるが、GII. 4 株に対しての抗体保有率が高いことは、近年の GII. 4 株の流行の反映と考えられた。今後とも、抗 NoV 抗体保有率の推移と実際に流行した NoV の遺伝子型との相関関係を継続調査することにより、次シーズンの流行遺伝子型や流行規模の予測等の可能性についても検討したい。

E. 結論

1. 平成 20 年度の感染性胃腸炎の流行規模は、前年度並みであったが、NoV の集団発生事例は大きく減少した。
2. 散発性胃腸炎患者から検出される NoV の 遺伝子型は、前年度と比べて GII. 4 型が占める割合が減少したのに対し、GII. 3 型及び GII. 6 型の割合が増加した。
3. SaV GI 型のみが検出され、19 年度、全国的に高頻度に検出された SaV GIV 型は検出されなかった。

4. 7 種の NoV ウイルス様粒子に対する抗体保有状況を比較検討した結果、GII. 4 株に対する保有率が最も高く、近年の GII. 4 流行の反映と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kobayashi S., Fujiwara N., Takeda N. and Minagawa H. Seroepidemiological study of norovirus infection in Aichi Prefecture, Japan. *Microbiol. Immunol.* **53**: 356–359, 2009

2. 学会発表

小林慎一、伊藤 雅、山下照夫、皆川洋子：平成 20 年度の愛知県におけるノロウイルスとサポウイルスの検出状況. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京都、2009 年.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表 1 散発性胃腸炎患者からのノロウイルスとサポウウイルスの月別・
遺伝子型別検出状況（平成 20 年度）

	NoV GI	NoV GII					SaV.
	GI.7	GII.3	GII.4	GII.6	GII.12	GII.13	SaV.I
4月			1				
5月							
6月							
7月							
8月							
9月							
10月							
11月		5	6	8			1
12月		8	24	9			2
1月		2	23	2	1		
2月	1		2			1	
3月			2				

表 2 胃腸炎集団発生事例から検出された
ノロウイルスの月別・遺伝子型別の事例数

	NV GI		NV GII		
	GI.1	GI.14	GII.3	GII.4	GII.6
4月	1				
5月		1			
6月					
7月					
8月					
9月					
10月					
11月					
12月					
1月			1	1	1
2月				1	
3月					

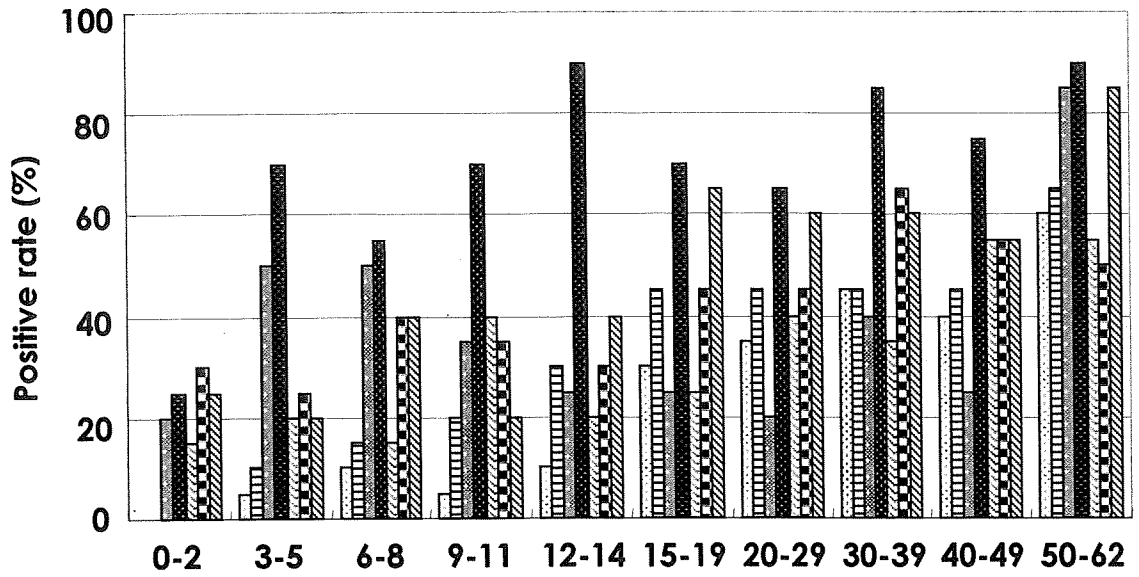
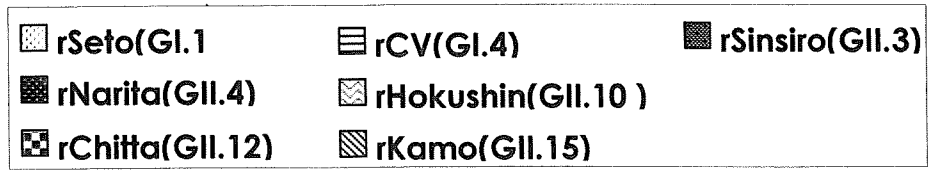


図1 ノロウイルスに対する愛知県民の抗体保有状況

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
「食品中のウイルスの制御に関する研究」
研究分担報告書

パンソルビン・トラップ法による食品検査法の構築(検討 1)

研究分担者 齋藤博之 秋田県健康環境センター・保健衛生部

研究要旨

食品検体からノロウイルス(NV)を検出するための実践的な手法としてパンソルビン・トラップ法(パントラ法)の開発を本研究事業において着手した。今年度は最終年度として、利便性向上に加えて GⅡ/4 以外の血清型への対応を視野に入れ、それに必要なプロトコル改良を行った。食品を超音波処理することで、NV を洗い出す操作に一定の基準を設けることができ、特に油を多く含む食品に対して有効であった。また、 α -Amylase による前処理を行うことで RNA 抽出液の凍結保存中に炭水化物の沈澱が生じるという問題を解決できた。食品洗滌液を改良することで、パンソルビンの結合性が向上し、プール血清やブロードバンド・モノクローナル抗体の使用が可能となった。前者については GⅡ/4 以外の血清型でも検出可能であることを確認した。後者については抗体添加量を増やすことで実用可能であることが示された。今後はこれらの抗体の生産・安定供給体制の確立が新たな課題となった。本法を用いることで一般的な食品から NV を検出することが可能となれば、調理従事者の衛生管理意識の一層の向上を促すことに繋がり、食中毒の抑止効果が期待できるものと考えられた。

A. 研究目的

ウイルス性食中毒の大部分を占めるのがノロウイルス (NV)であり、対策として二枚貝の汚染実態調査や、調理従事者への衛生教育等が進められてきている。しかしながら、原因として疑われる食品からのウイルス検出は、その作業の困難さからこれまでほとんど検討されてこなかったため、具体的な汚染ルート の 解明に 決め手 を 欠いているのが実状である。本研究事業では、固形、液状、練り物、油物などの一般的な食品から NV を検出する手法としてパンソルビン・トラップ法

(パントラ法)を開発し、この問題を解決するための糸口を見出すことができた。昨年度までの研究でパントラ法の基本プロトコルはほぼ完成したが、今年度はより汎用性を向上させるために、GⅡ/4 以外の血清型に対する適用を中心に改良を行った。検討・解決すべき点は次の 5 点に集約される。①②③は利便性向上、④⑤は多種類の血清型への対応に関する検討である。

- ①油を多く含む食品では油滴に NV が包埋されて検出効率が落ちる可能性があること。
- ②炭水化物混入対策の強化。

③処理時間短縮の試み。

④ブロードバンド・モノクローナル抗体使用のための条件検討。

⑤プール血清を使用することによる、様々な血清型への対応。

本稿では①②④について改良策を報告することとし、③と⑤の詳細については別稿(研究協力報告書:東方・福井)を参照されたい。

B. 研究方法

1. 研究材料

汚染実験に用いる食品として、市販されているポテトサラダと焼ソバを用いた。また、検出対象となるNVとして、秋田県内の集団感染事例において搬入された保存糞便検体を用いた。次のとおり Accession No. と採取年月を示す。

G II/4 型: AB293424, 2006 年 12 月

G II/5 型: AB448707, 1993 年 3 月

G II/18 型: AB083780, 1995 年 11 月

G I/8 型: AB448734, 2008 年 6 月

2. 試薬類

1) 抗 NV 血清

国立感染症研究所で VLP から作製したウサギ免疫血清 19 種(抗 GI/1, 2, 3, 4, 8, 11 GII/1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 17)を単味、またはプール血清として用いた。

2) 抗 NV ブロードバンド・モノクローナル抗体

堺市衛生研究所で樹立したハイブリドーマから得られたマウス腹水 4 種類(MAb#22: broad, MAb#23: broad, MAb#14: G II specific, MAb#3912: G I specific)を混

合して用いた。

3) 食品洗滌液

Tris-HCl (pH8.4) - 0.5M NaCl - 0.1% Tween20

4) パンソルビン

黄色ブドウ球菌を熱処理してホルマリン固定したものの懸濁液で、和光純薬から購入

5) 再懸濁液

0.1% Na-Citrate (pH4.2)

6) フェノール系 RNA 抽出キット

TRIzol-LS (invitrogen)を使用

7) カラム方式の RNA 抽出キット

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)を使用

8) 逆転写反応エンハンサー

RTmate(ニッポンジーン)を使用

9) DNase I (RT Grade) 及び RNase inhibitor

ニッポンジーンの製品を使用

10) アミラーゼ

前処理用: 枯草菌由来 α -Amylase 粉末(和光純薬)を使用

後処理用: α -Amylase Ultrapure(ニッポンジーン)を使用

11) 食品処理袋

サニスペックテストバッグ(アズワン)を使用

3. パンソルビン・トラップ法の全体の手順

基本的な操作の流れを図 1 に示した。なお、プール血清とモノクローナル抗体使用時にはプロトコル全体を 1/10 にスケールダウンして検討を行った(再懸濁以降は通常スケール)。昨年度のプロトコルからの主な改良点は、次の通りである。本稿では、これらの改良に至った経緯について順次考察を加

えていく。

- ①食品からNVを効率的に遊離させることができるように超音波処理を加えた(図 2A)。
- ②食品処理袋によって炭水化物が効率的に除去できるようになったが、最終的に得られた抽出 RNA を凍結保存してから解凍すると沈澱が生じることがわかった(図 3A)。そのため、混入対策を強化するため処理途中で粉末の α -Amylase を添加した。途中から添加するのは、 α -Amylase 粉末には不溶性成分が含まれていることと、超音波処理による失活を避けるためである。
- ③モノクローナル抗体の実体を成すマウス IgG はいくつかのサブクラスに分かれており、その大半を占める IgG1 は Protein A(パンソルピン)への親和性が弱いことがわかっている(表 1)。抗血清の成分であるウサギ IgG についても、プール血清使用時には大量の IgG を結合させる必要がある。この問題の解決のため食品洗滌液に 0.5M NaCl を添加した(公開特許公報 昭 61-12631)。

なお、図 1 の各ステップの処理時間について、短縮が可能かどうかは別稿にて検討した(詳細は「研究協力報告書:東方・福井」を参照)。

4. NV の検出

cDNA の合成の前に、最終的に得られた RNA 抽出液(60 μ L)から 8.5 μ L を取り、DNase I 及び α -Amylase Ultrapure を各 1 μ L、RNase inhibitor を 0.25 μ L、5 \times 逆転写 buffer (添付)を 4 μ L 加えた後、蒸留水で反応量を 15.5 μ L とし、37 $^{\circ}$ C 10 分、65 $^{\circ}$ C 5 分のインキュベーションを行った。その後、特異的プライマー(COG2F/R)、dNTP、RTmate、及び逆転写酵素を追加

して cDNA を合成した(反応容量 20 μ L)。特異的プライマーとして COG2F と COG2R の両方を加えたのは、引き続いて行われる PCR の際にプライマーの非対称化を避けるためである。合成した cDNA 溶液を 5 μ L 取り、Kageyama ら(J Clin Microbiol, 41, 1548~1557 (2003))のリアルタイム PCR 法で NV を検出した。使用した機器はロシュ製「LightCycler 350S」、及び「LightCycler 480」で反応容量は 20 μ L である。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 超音波処理の効果

油の多い食品の代表として焼きソバを用いて、図 2A に示すとおり食品処理袋を超音波洗浄機に浸漬した。処理後の食品検体の状態を図 2B に示したが、処理時間が 3 分、10 分と延びるに従って、油成分が洗滌液と混じりあい、機械的乳化に至っているのがわかる。図 2C に示した Real-time PCR の増幅曲線のコピー数から算出した回収率は、無処理の場合で 37%、10 分処理で 46%と改善された。

2. α -Amylase による前処理の効果

昨年度の本研究で、抽出した RNA から cDNA を合成する段階で α -Amylase 処理を行うことで、検出効率が向上することがわかった(便宜上 “後処理” と呼ぶ)。しかし、抽出した RNA を -80 $^{\circ}$ C に凍結保存し、後日検査を再開しようとした際に、炭水化物の沈澱が新たに生じてくるという問題があった。食品処理袋を使用することで、一定の改善

は見込めたが、精製カラムの目詰まりを防止し RNA を適切に保存するために、プロトコルの早い段階での α -Amylase 処理(便宜上“前処理”と呼ぶ)を検討した。プロトコルの最初に用いるという性格上、処理量が多く(50mL)なるため、枯草菌由来の廉価な粉末を使用し、超音波処理で酵素活性が失われないように、途中で添加するようにした。また、この粉末は不溶性成分を含むため完全には溶解しないが、3,000rpm 30分の遠心で食品残渣を除去する段階で一緒に沈澱するため問題はない。図 3A では α -Amylase 前処理の効果を比較するため凍結保存した RNA の濁りを観察した。凍結前の RNA 抽出液は処理袋や α -Amylase 前処理の有無に関わらず透明であった。処理袋を使わなかった場合には、大量の炭水化物が混入し、たとえ一部が精製カラムで除去されたとしても最後まで残留し、凍結後にはそれが顕著に現れた(沈澱が生じた)。食品処理袋を使用すると、相当な改善が認められたが、それでも凍結後の濁りは少し残っていた。 α -Amylase 前処理を行った場合には凍結後も濁りは観察されなかった。

図 3B には増幅曲線を示したが、ここでの回収率は、処理袋も α -Amylase も一切用いなかった場合が 13%、処理袋を用いた場合が 23%、処理袋を用いて α -Amylase 前処理を行った場合が 25%であった。cDNA 合成時に α -Amylase 後処理を追加すると、回収率は 30%となり、同時に蛍光強度も約 2 倍になった。

3. NaCl 添加による IgG とパンソルビンの結合性向上

パントラ法を用いるためには抗血清の安定

供給が不可欠であるが、将来的にはブロードバンド・モノクローナル抗体の使用も視野に入れておく必要がある。表 1 には動物種ごとの IgG と ProteinA との結合性を示した。抗血清を用いる場合はウサギ IgG であるため、結合性そのものには大きな問題は生じない。しかし、モノクローナル抗体はマウス IgG であり、サブクラスが IgG1(割合が最も高い)であった場合には結合性が弱いことが問題となる。ハイブリドーマ選択の際に IgG2a や IgG2b 等の他のサブクラスのものが見られればよいが、スクリーニングの優先順位がブロードバンドでの反応性あることから、それを望むのは難しい。本研究で用いたモノクローナル抗体も 4 種類全てが IgG1 である。そこで、マウス IgG1 であっても ProteinA へ結合するような条件を検討したところ、「免疫グロブリン G のプロテイン A への結合方法」という発明名称で Bio-Rad 社が特許を保有していることがわかった。ただし、この特許は期限が切れているため現在では自由に使用できることになっている。特許の記載内容は NaCl を添加することでマウス IgG1 であっても ProteinA と結合させることができるというものであった。また、ウサギ IgG であっても結合性が増すため、プール血清等を用いる際のパンソルビンのキャパシティ向上も期待できる。一方で、この特許は、IgG と ProteinA の結合に関してのみ記述されており、パンソルビンという菌体を用いることは考慮されていない。従って、NaCl の濃度を高くすることで IgG と ProteinA の結合性は増すにせよ、食品洗滌液の比重が高くなり遠心してもパンソルビンが沈澱しないという事態が起こり得た。本研究では NaCl を 0.5M で用いるようにしているが、1.0M を用

いたところ 3,000rpm 20 分の遠心ではパンソルビンの沈澱が不十分であった。

図 4 はこれまでの検討に用いてきた抗 G II /4 単味血清を使った実験系において、NaCl の効果を比較したものである。食品洗滌液に NaCl を加えない状態での回収率は 29% であったが、0.5M NaCl 存在下では 42% に向上し、蛍光強度も増大した。

4. プール血清への応用

NaCl を食品洗滌液に添加することで、パンソルビンのキャパシティ向上が期待できたため、19 種類の抗血清を各 5 μ L ずつプールして回収実験を行った結果を図 5A に示した。焼きソバを G II /4 型の NV で汚染させたものを被検体とした場合の回収率は抗 G II /4 単味血清では 92%、19 種プール血清では 55% であった。同様に G II /5 型と G I /8 型、及び抗血清プールには含まれないが G II /18 型 (Yuri 株) を用いた回収実験結果を図 5B~5D に示した。この 3 株については、抗血清を節約するため 1/10 スケール (洗滌液 5mL、抗血清各 0.5 μ L、パンソルビン 30 μ L) で行った。表 2 に回収率を比較したが、単味血清と比べるとプール血清では半分~1/3 程度の数値となった。G II /18 についてはプール血清に含まれていないものの 27% の回収率が得られた。

プール血清に関する詳細な検討は別稿 (研究協力報告書: 東方・福井) を参照されたい。

5. モノクローナル抗体の実用可能性の検討

モノクローナル抗体の反応性を評価するため、これまで様々な検討に用いてきた抗 G II /4 単味血清の段階希釈系列と比較した

結果を図 6 及び表 3 に示した。単味血清を希釈するほど回収率は下がるが、1/40 希釈から 1/80 希釈の間にモノクローナル抗体の回収率と等価になる領域があるのが見て取れる。抗 G II /4 単味血清のホモ抗体価は国立感染症研究所における ELISA での測定により、およそ 1,000 万倍であることがわかっているため、モノクローナル抗体 (マウス腹水) の見かけ上の抗体価を回収率と添加量から逆算すると、12,500~25,000 倍と見積もられた。このことから、理論上は添加量を増やせばモノクローナル抗体でも抗血清と同等の回収率が期待できることになる。

D. 考察

1. 利便性の向上に関する改良

1) 超音波処理による NV 粒子の遊離

食品に付着している NV を洗滌液中に効果的に遊離させるためには、処理袋を念入りに揉みほぐす必要があるが、その程度に関して一定の基準を設けることは難しいのが実状である。また、焼ソバなどの油を多用した食品の場合は油滴中に NV が包埋されて、その後の処理がうまくいかない可能性もある。油に対する解決法の一つとして洗滌液に Lipase (ブタ膵臓由来: 和光純薬) を添加する方法も検討したが、黄色ブドウ球菌の表面脂質も分解されて構造が壊れるため本法に用いることはできなかった。ただし、Lipase 処理によって油と洗滌液が均一になるため、PEG 沈澱法で NV 回収を試みる場合には有効と考えられる。次に検討したのは超音波による機械的乳化であり、図 2A に示すとおりガラス器具洗浄用の超音波洗浄機に処理袋を浸漬することで、油滴を細かく分散さ

せて NV 粒子を遊離させることを目的としている。図 2B では、超音波処理によって油と洗滌液が均一に混じり合っているのがわかる。また、水中で超音波を発すると微細な泡の消長に伴う衝撃波が持続的に発生し(キャビテーション効果)、部分的かつ瞬間的な圧力は $1,000\text{kg/cm}^2$ に達する。このことは、油物に限らず食品に付着した NV を効率良く洗滌液中に遊離させるのに利用することができる。図 2C では超音波処理によって回収率が約 3 割向上しているが、食品の種類によってはもっと差が開く可能性もある。超音波洗浄機はほとんどの試験研究機関において常備されている機器であり、また廉価で入手できるため、NV の洗い出し作業に一定の基準を設定する意味でも用いるのが望ましいと考えられた。

2) α -Amylase による前処理

炭水化物は核酸と同じ挙動を示すため、除去が困難で結果に影響を及ぼすことは前から知られていた。昨年度の研究では、食品処理袋を使用することで食品残渣を取り除く方法と逆転写反応直前に α -Amylase によって混入した炭水化物を分解する方法(後処理)について検討し、両者とも効果が認められた。しかしながら、図 3A に示すとおり、食品処理袋を使用して良好な結果が得られたと思われる RNA 抽出液であっても、 -80°C で凍結保存後に解凍すると炭水化物の沈澱が生じてくる場合があった(RNA も共沈する)。この問題を解決するために、食品洗滌液に α -Amylase 粉末を加えて、その後の抗原抗体反応中に炭水化物の分解処理を並行して行うようにした(前処理)。その結果、凍結保存後も沈澱は生じなくなった(図 3A)。図 3B の増幅曲線では、食品処理

袋のみの場合と比べてあまり差は認められないが、プロトコル上での作業負担にはならないのと、炭水化物の沈澱により RNA をロスするリスクを避けるために、 α -Amylase による前処理をプロトコルに加えておくのは意義があるものと思われる。また、図 3B によると cDNA 合成時に再度 α -Amylase 処理を行うことで回収率の更なる向上が見込めるため、前処理と後処理は併用するのが現実的である。

2. 多種類の血清型への対応

1) 食品洗滌液の改良

多くの血清型がある NV に普遍的に対応するためにはブロードバンドのモノクローナル抗体の利用が望ましい選択となる。また、抗体の安定供給といった面から考えても有利である。しかしながら、表 1 に示すとおり、モノクローナル抗体で最も割合の高いマウス IgG1 は、ウサギ IgG と比べて ProteinA との結合が弱いという問題を抱えている。本研究ではその解決策として、食品洗滌液に NaCl を 0.5M になるように添加した。この手法は Bio-Rad 社が検討を加えて特許を保有していたが、平成 18 年に期限をむかえたため現在は自由に用いてよいことになっている。NaCl 添加の効果はこれまで用いてきたウサギ IgG に対しても認められ(図 4)、パンソルビンに対する結合能の向上が期待できる。プール血清を用いた場合には、IgG の量が単味血清の場合と比べて最大 19 倍(19 種混合)に増える計算になるため、パンソルビンのキャパシティを増やす意味でも NaCl 添加は意義があるものと考えられた。

2) プール血清を用いた検討

食品洗滌液への NaCl 添加によってパン

ソルビンのキャパシティが向上したため、19種類の抗血清を混合したプール血清を用いたNV回収実験を行った。図5A～図5DにはそれぞれGII/4、GII/5、GI/8、GII/18についての増幅曲線を示した。表2にはそれぞれの回収率を示したが、単味血清と比べてプール血清では半分～1/3程度の数値であった。プール血清を用いた場合には、無関係の血清型に対する大量のIgGが競合してパンソルビンに結合するため回収率への影響は避けられない。むしろ、あらかじめNaCl添加によってキャパシティを向上させていたため、この程度の影響で済んだという見方もできる。Real-time PCRでは2サイクル以内の差であり、また実際の検査局面ではNested PCRを行うことが想定されるため、深刻な問題にはならないと考えられる。また、参考までにGII/18型のreference strainであるYuri株を用いた回収実験も行ったが、プール血清の中に対応する血清が含まれていないにもかかわらず回収することができた(図5D)。いずれかの血清成分が交差反応を起こしている可能性が高いが、本法の目的としては特に問題視する必要はない。

上記以外の血清型も含む詳細な検討は別稿(協力研究報告書:東方・福井)を参照されたい。

3) ブロードバンド・モノクローナル抗体の実用可能性

食品洗滌液へのNaCl添加によってマウスIgG1であってもパンソルビンへ結合させることができるようになったが、抗体価が実用的なレベルに達しているかどうか不明であった。そこで、抗GII/4単味血清の段階希釈系列を作り、モノクローナル抗体がどの段階

に相当するかを検討した(図6)。回収率と添加量から逆算するとモノクローナル抗体の抗体価は12,500～25,000倍相当と見積もられた(表3)。理論上は抗体添加量を増やすことで抗血清を用いた場合と同等の回収率が得られると考えられるが、そのためには1検体(50mL)当たり2mL程度のマウス腹水が必要な計算となるため現実的とは言えない。そこで次なる可能性として、ハイブリドーマを回転ボトル等で大量培養(10L程度)して培地からIgGを濃縮・精製する方法がある。NVに対する特異性は、Real-time PCRで担保されているため、IgGの精製に当たってはアフィニティクロマトのような煩雑なプロセスは不要で、硫酸沈澱による粗精製で十分と考えられる。

3. パントラ法の総括と今後の展開

安定供給という面で課題は残るものの、プール血清を用いることで、多くの血清型に対応させることが可能となり、食品からのNV検出という目標を達成することができた。今後は抗血清の生産・供給体制を作りつつ、引き続きモノクローナル抗体の利用を検討することになる。本法は添加する抗体さえあればNV以外にも適用可能であるため、サポウイルスやA型肝炎ウイルス等にも用いることが可能である。また、食品からウイルスを検出する方法を行政機関が所持していることを知らしめることによる食中毒の抑止効果(調理従事者の衛生管理意識の向上)も期待できると考えられる。

E. 結論

本研究ではカキ以外の一般的な食品からのNV検出法として、黄色ブドウ球菌を利用

したパントラ法の開発を進めた。昨年度までの段階でパントラ法の骨格はほぼ完成していたため、今年度は多くの血清型に対応させるためにプール血清とブロードバンド・モノクローナル抗体を用いた検討を行った。パンソルビンの結合性向上を図るための食品洗滌液の改良も含めていくつかのプロトコル見直しを行い、目標を達成することができた。今後は本法の実施に不可欠な抗血清やモノクローナル抗体の生産や安定供給をいかにすべきかが新たな課題となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

佐藤寛子、柴田ちひろ、斎藤博之、安部真理子、山脇徳美：ノロウイルス抗原キット”クイック Ex・ノロウイルス”の行政検査における有用性の検討、医学検査、Vol.58、No.4、321-325 (2009)

2. 学会発表

斎藤博之、東方美保、白土東子、田中智之：食品のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の実用化の検討、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

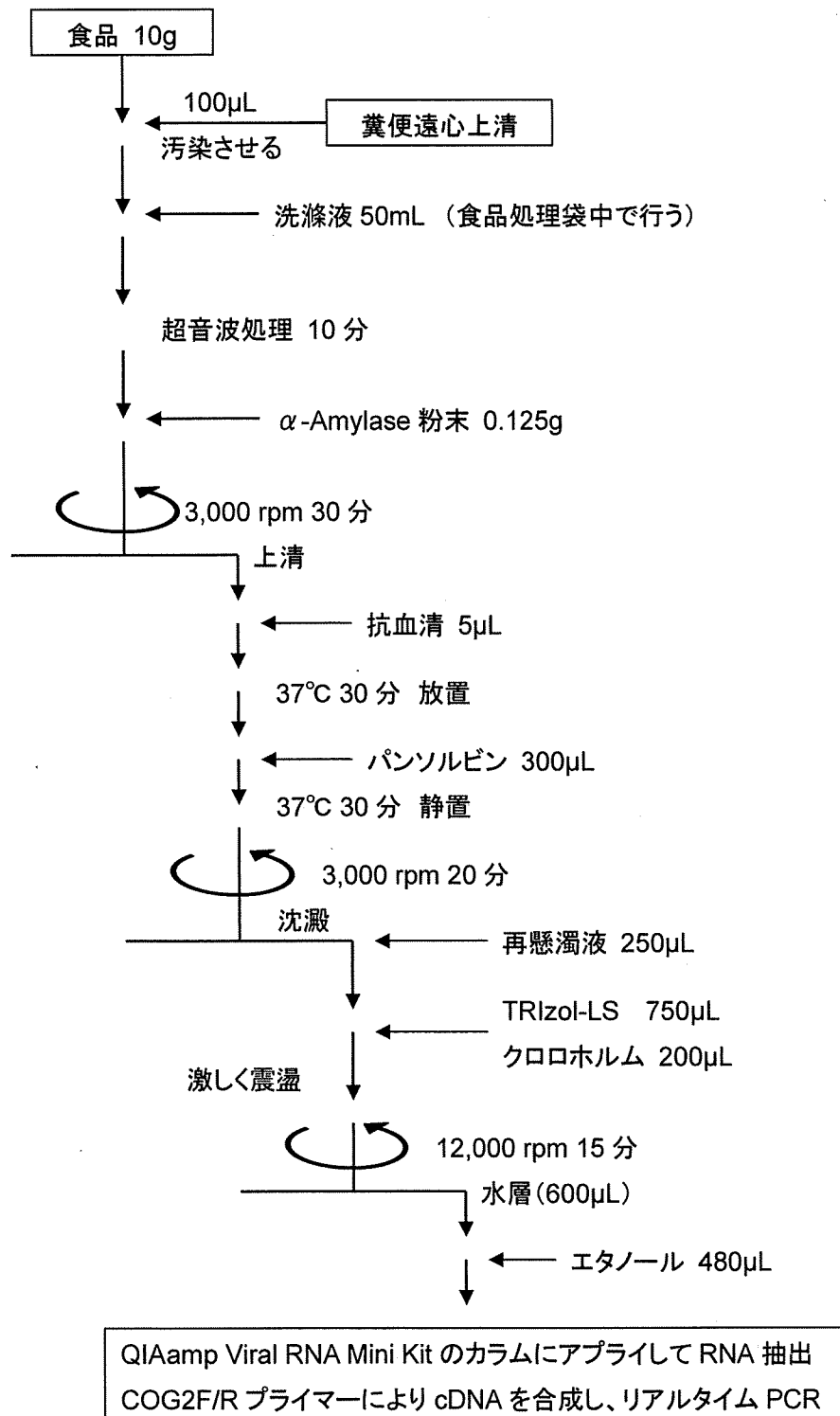


図 1 パンソルビン・トラップ法の操作手順 (Ver.3)

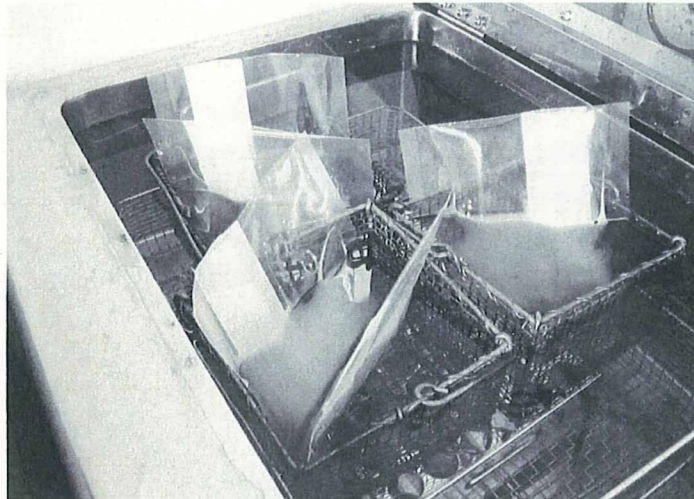


図 2A 超音波処理の実際



図 2B 超音波処理後の乳化 (左から無処理・3分・10分)

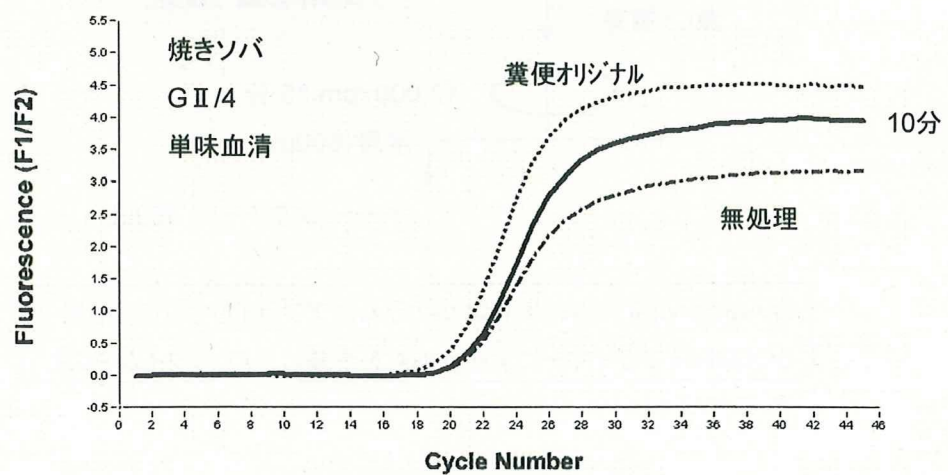


図 2C 超音波処理による回収率の比較 (増幅曲線)

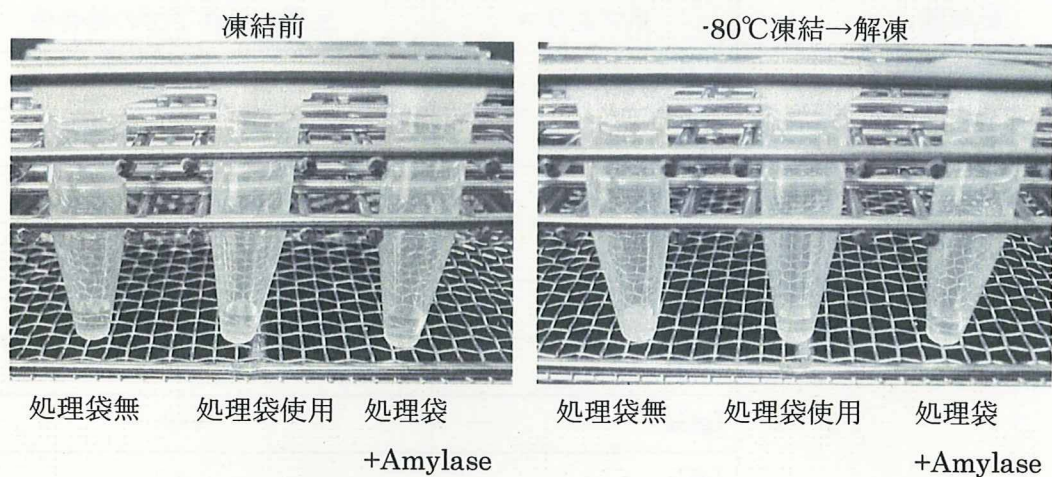


図 3A 凍結保存後の炭水化物の沈澱

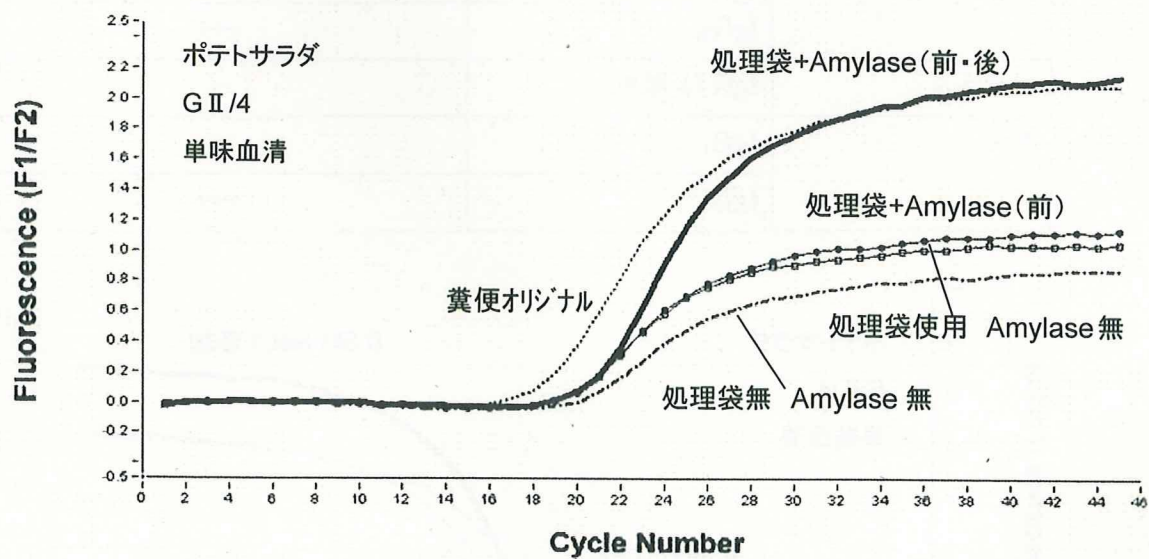


図 3B α -Amylase 処理の効果 (増幅曲線)

表1 IgG の ProteinA への結合性 (生化学データブックより抜粋)

動物種	サブクラス	生理的条件下での結合性
ウサギ	IgG (1 種類)	+++
マウス	IgG ₁	+
	IgG _{2a}	+++
	IgG _{2b}	+++
	IgG ₃	+++
ヒト	IgG ₁	+++
	IgG ₂	+++
	IgG ₃	+
	IgG ₄	+++
モルモット	IgG (1 種類)	+++
ラット	IgG ₁	++
	IgG _{2a}	—
	IgG _{2b}	—
	IgG _{2c}	+++
ニワトリ	IgG (1 種類)	—
ヤギ	IgG ₁	—
	IgG ₂	+++

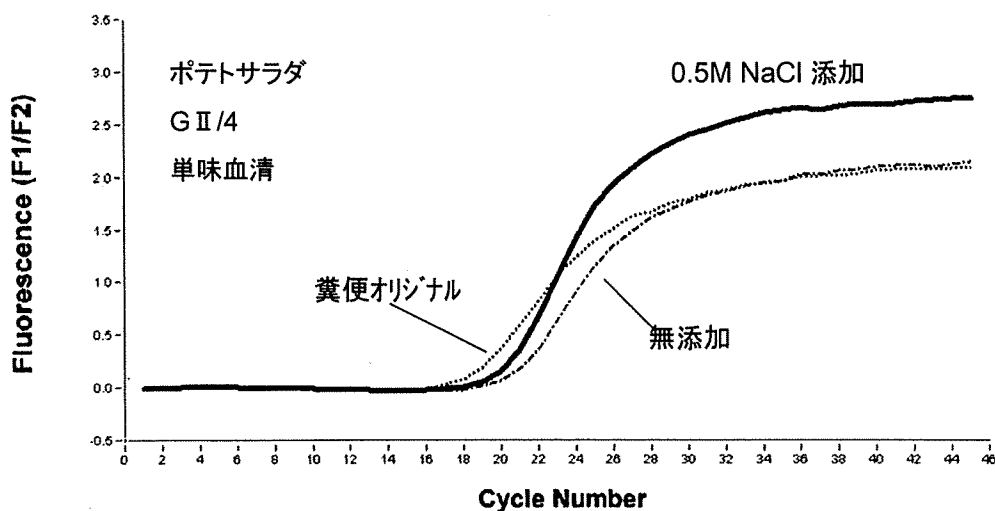


図4 食品洗滌液への NaCl 添加の効果 (増幅曲線)

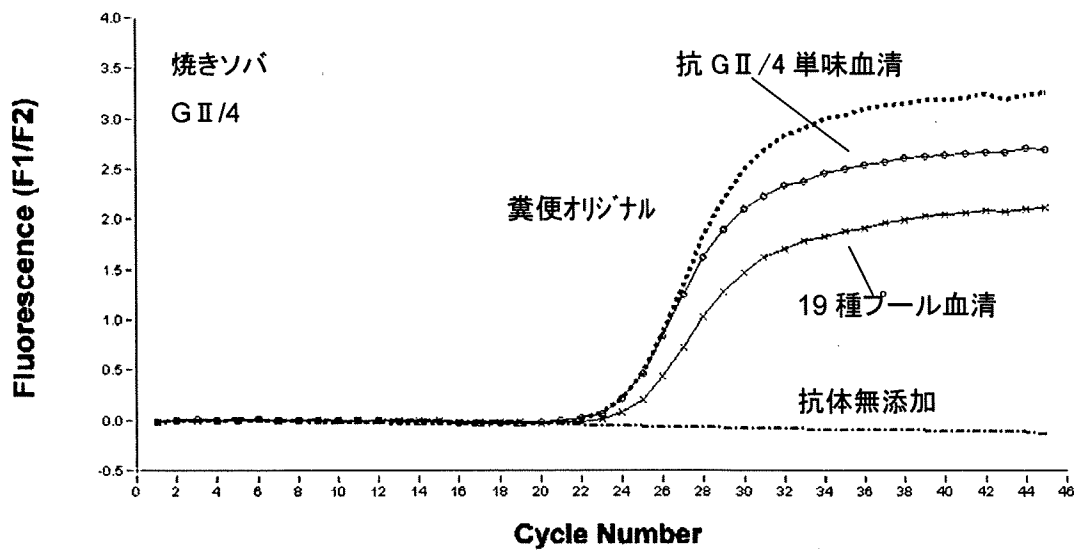


図 5A GII/4 型による汚染食品からの NV 回収 (増幅曲線)

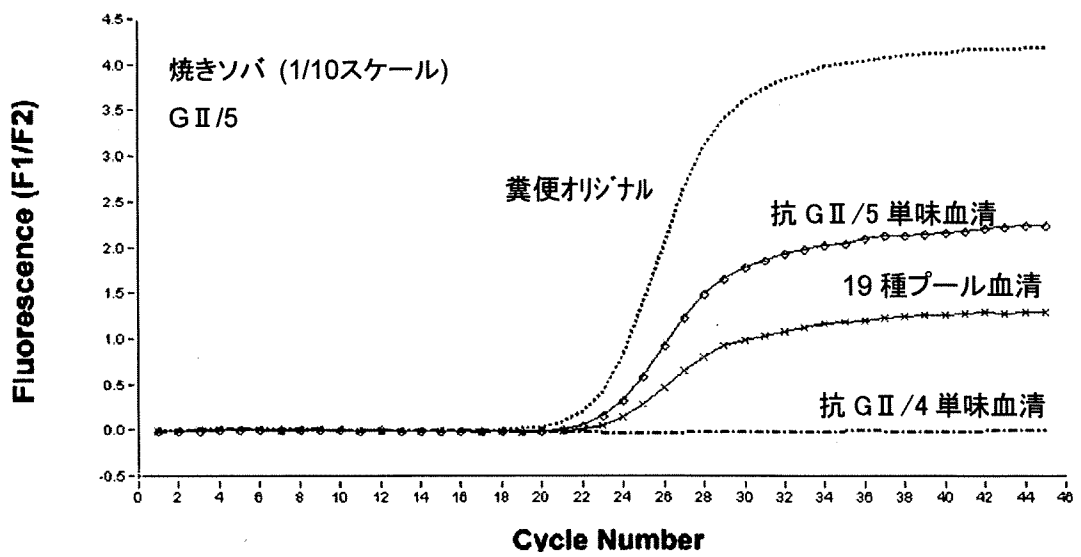


図 5B GII/5 型による汚染食品からの NV 回収 (増幅曲線)

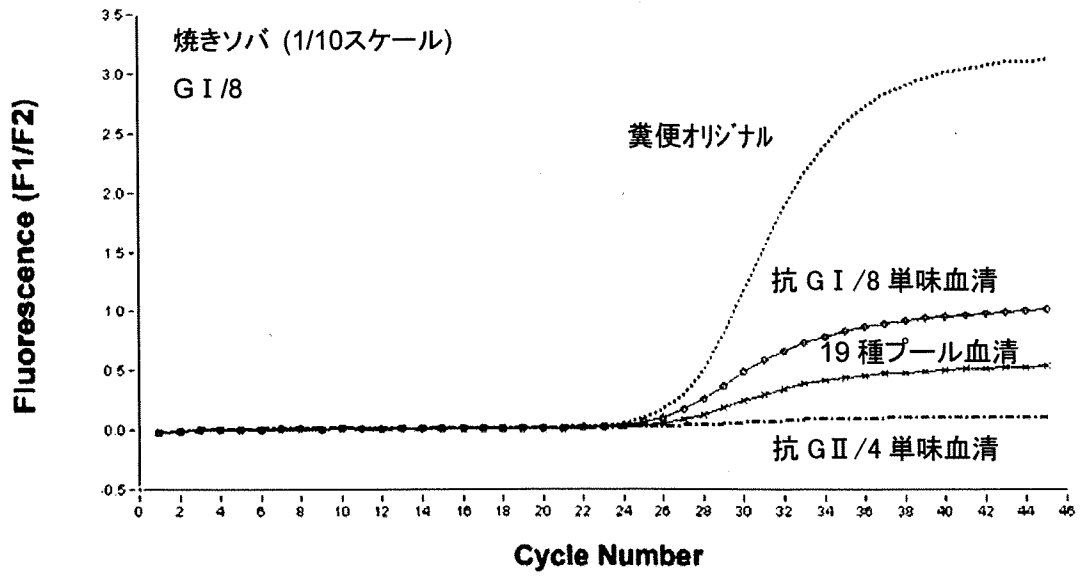


図 5C GI/8 型による汚染食品からの NV 回収 (増幅曲線)

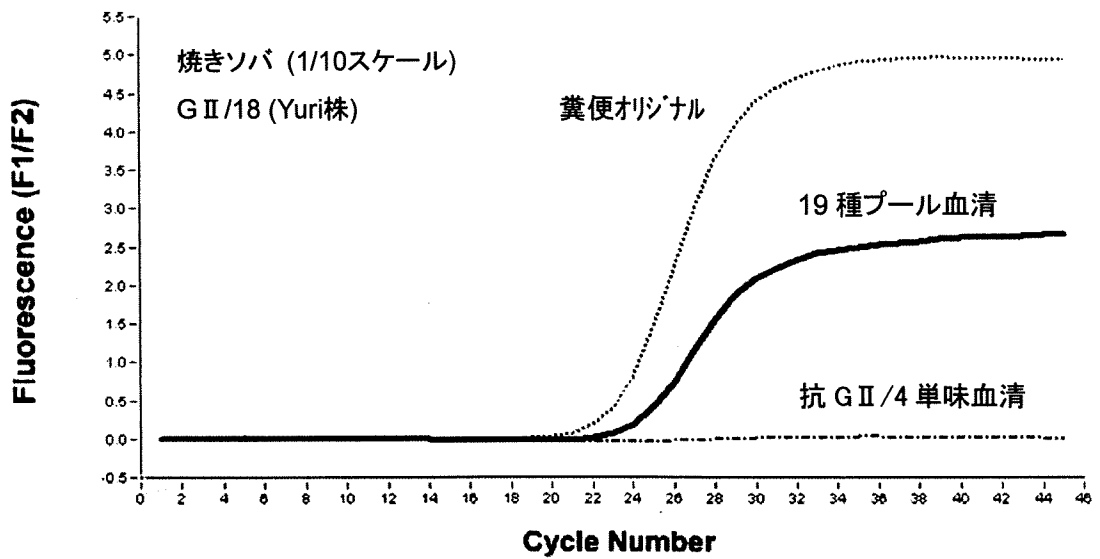


図 5D GII/18 型 (Yuri 株) による汚染食品からの NV 回収 (増幅曲線)

表2 プール血清によるNVの回収率 (%)

NV	抗血清	抗 G II /4 単味	抗 G II /5 単味	抗 G I /8 単味	19種 プール
G II /4		92			55
G II /5		N.D.	35		18
G I /8		N.D.		41	13
G II /18(Yuri 株)		N.D.			27

図5A～図5Dの増幅曲線から算出した。G II/4は通常スケール(図1)、他は1/10スケールによる検討を行った。

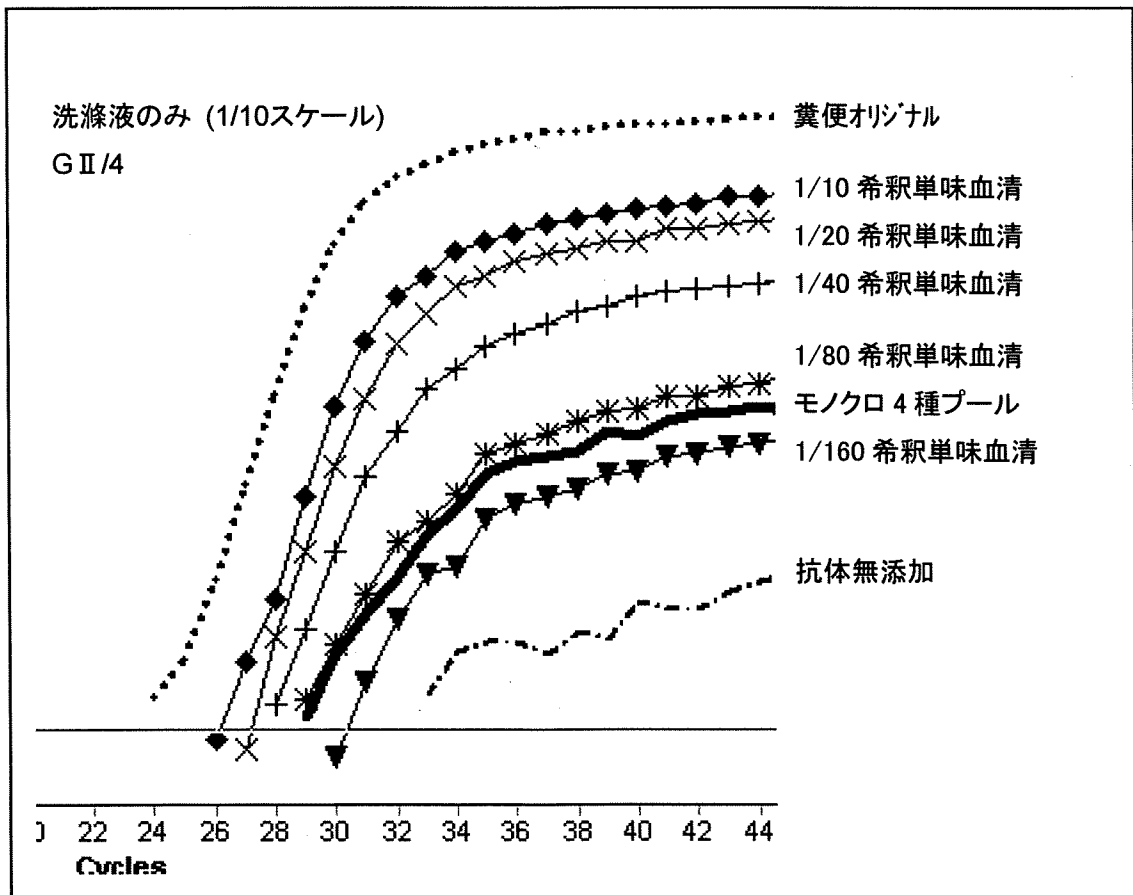


図6 段階希釈した単味血清とモノクローナル抗体の比較(増幅曲線)
 実験スケールは1/10(全量5mL)で行った。単味血清は各希釈液を5μL、モノクローナル抗体は腹水を4種類とも50μL添加した。

表 3 段階希釈した単味血清とモノクローナル抗体の比較 (回収率)

添加抗体	抗体価 (終濃度)	回収率 (%)
1/10 希釈単味血清	×1,000	33
1/20 希釈単味血清	×500	18
1/40 希釈単味血清	×250	11
モノクロ 4 種プール	(×125~250)	9.1
1/80 希釈単味血清	×125	7.8
1/160 希釈単味血清	×62.5	2.3
抗体無添加		N.D.

回収率は図 6 の増幅曲線から算出した。単味血清のホモ抗体価については、ELISA による測定でおよそ 10,000,000 倍であることがわかっている。モノクローナル抗体 (マウス腹水) の見かけ上の抗体価は回収率と添加量から逆算すると 12,500~25,000 倍となる。